

NOTA CIENTÍFICA

Registro de *Nephridiophaga* sp. (Protista: Nephridiophagidae) en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) del Sur de la región Pampeana

PLISCHUK, Santiago y Carlos E. LANGE

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), CIC - CONICET CCT La Plata – UNLP. Calle 2 N° 584 (B1902CHX) La Plata, Argentina; e-mail: santiago@cepave.edu.ar

Record of *Nephridiophaga* sp. (Protista: Nephridiophagidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) of the southern Pampas

■ **ABSTRACT.** During surveys for the detection of protists associated to Apidae in the Pampas region, biconcave oval spores, and spore clumps were observed in the Malpighian tubules of honeybees from Dufaur, Saavedra county, southwestern Buenos Aires province. Mature spores measured $4.8 \pm 0.05 \times 2.4 \pm 0.03 \mu\text{m}$, and mean spore load was $5.71 \pm 1.49 \times 10^6$ per honeybee. Detections were from July to October 2006, and prevalence in positive colonies ranged from 1 to 16.7%. Morphology of the spores, the site of development, and the identity of the host species suggest that the isolated microorganism belongs to the genus *Nephridiophaga* and would be *N. apis* Ivani, the type species, knowledge on which is extremely limited. The finding constitutes the first record of a nephridiophagid in honeybees outside of Europe.

KEY WORDS. Haplosporidia. Malpighian tubules. *Nephridiophaga apis*. *Nosema*.

■ **RESUMEN.** Durante estudios prospectivos tendientes a la detección de protistas asociados a ápidos en la región Pampeana, se observó la presencia de esporos ovales bicóncavos y grupos de esporos (cúmulos) en los túbulos de Malpighi de abejas de Dufaur, partido de Saavedra, sudoeste de la provincia de Buenos Aires. Los esporos maduros midieron $4,8 \pm 0,05 \times 2,4 \pm 0,03 \mu\text{m}$ y la carga (intensidad) promedió $5,71 \pm 1,49 \times 10^6$ esporos/abeja. Las detecciones se efectuaron entre julio y octubre de 2006 y la prevalencia en las colmenas positivas osciló entre 1 y 16,7 %. Las características morfológicas de los esporos, el lugar de desarrollo y la especie huésped involucrada sugieren que el microorganismo en cuestión, pertenece al género *Nephridiophaga* y sería *N. apis* Ivani, especie tipo cuyo conocimiento es extremadamente limitado. El hallazgo constituye el primer registro de un nefridiofágido asociado a *A. mellifera* fuera del continente europeo.

PALABRAS CLAVE. Haplosporidia. *Nephridiophaga apis*. *Nosema*. Túbulos de Malpighi.

Las especies de la Familia Nephridiophagidae Sprague ("nefridiofágidos") son protistas esporogénicos simbioses en los túbulos de Malpighi de insectos, mayormente de los órdenes Dictyoptera y Coleoptera (Lange, 1993; Hausmann *et al.*, 2003). Esta familia, en ocasiones incluida en el Phylum Haplosporidia o Ascetospora (Perkins, 2000), ha permanecido por años como un grupo de filiaciones taxonómicas inciertas (Lange, 1993), hasta que Radek & Herth (1999) observaron divisiones criptomitóticas en *Nephridiophaga blatellae* (Crawley) Woolever y sugirieron un vínculo filogenético con los hongos. Posteriores análisis moleculares de la misma especie, sumados a la detección de quitina fúngica en la composición de la pared de sus esporos, avalarían preliminarmente esa relación (Wylezich *et al.*, 2004). La morfología de los esporos maduros es la característica diagnóstica saliente compartida por las 15 especies descritas de nefridiofágidos (Lange, 1993; Fabel *et al.*, 2000; Radek *et al.*, 2011). Las especies forman esporos ovales con algún tipo de concavidad o depresión mediana longitudinal. Normalmente constituyen formas bicóncavas.

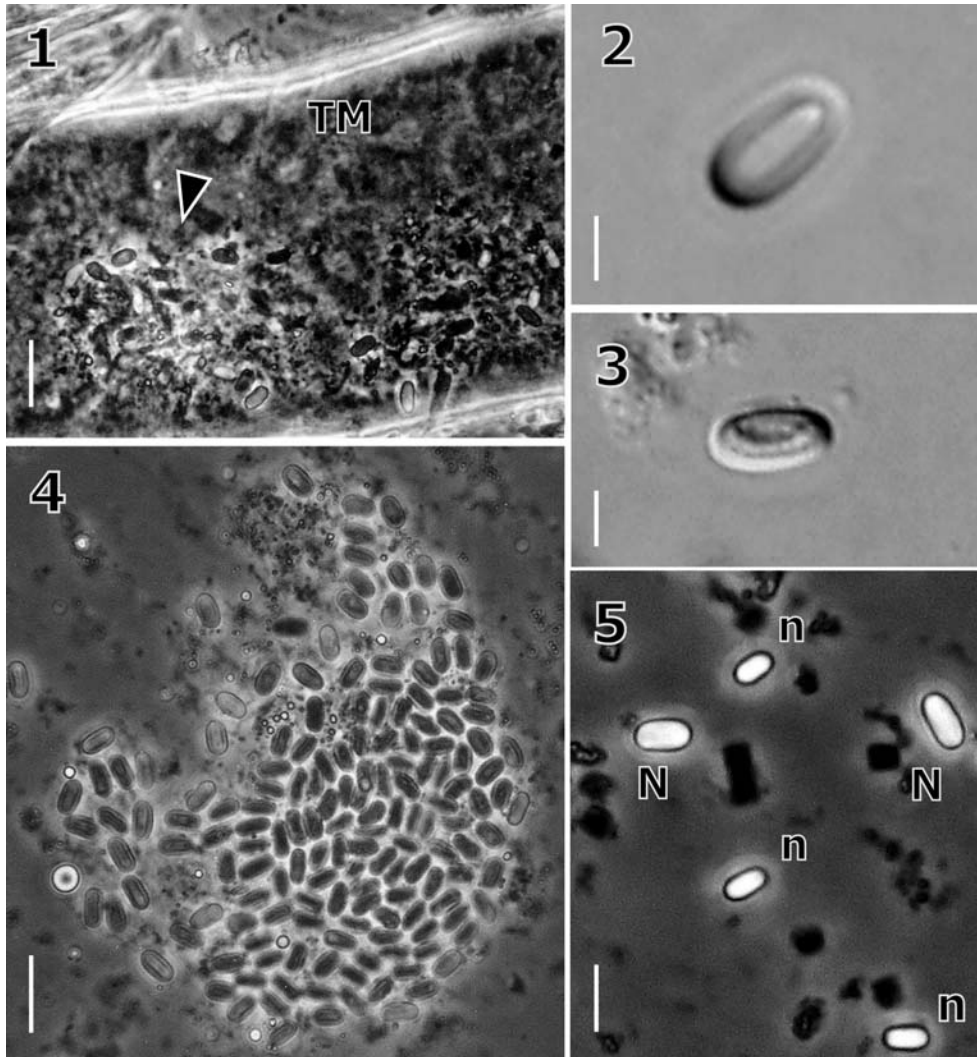
En Argentina, se han detectado afecciones del sistema digestivo y órganos excretores de las abejas (*Apis mellifera* L.) adultas, producto de la acción de otros eucariotas unicelulares formadores de esporos o quistes, tales como microsporidios (Microsporidia) y amebas (Amoebozoa), respectivamente (Ringuelet, 1947; Plischuk & Lange, 2010). Dada la gran importancia económica de la industria apícola nacional y el hecho que el registro histórico a nivel mundial de nefridiofágidos en *A. mellifera* se limita a un único hallazgo en Europa (Ivani, 1937), estimamos de interés comunicar la presencia de uno de estos protistas en las abejas de nuestro país.

Durante los estudios orientados a la identificación de patógenos asociados a ápidos polinizadores, se colectaron muestras de *Apis mellifera* de colmenares comerciales situados en diversos puntos de la región Pampeana, entre marzo de 2006 y febrero de 2010 (Plischuk, 2010; Plischuk & Lange, 2010). Las muestras fueron conservadas en

alcohol etílico 70 o bajo congelación (-32 °C) hasta su examen. La detección y aislamiento de protistas se llevó a cabo mediante técnicas de disección y homogeneización de los insectos en agua bidestilada (Lange & Henry, 1996; Undeen & Vávra, 1997). Su observación, caracterización y fotografiado se efectuó utilizando un microscopio Nikon Optiphot-2 con contraste de fases (x400; x1000). La intensidad de las infecciones (carga de esporos) se estimó con una cámara de Neubauer (Undeen & Vávra, 1997) y es indicada como promedio, ES y rango. Las medidas de los esporos se tomaron con micrómetros oculares y se expresan también como promedio, ES y rango.

Las observaciones de homogenatos de abejas provenientes de la localidad de Dufaur, partido de Saavedra, sudoeste de la provincia de Buenos Aires (37° 48' 54,42" S; 62° 13' 27,82" O) revelaron la presencia de esporos cuyas características no concordaban con las de esporos de microsporidios o quistes de amebas. Las disecciones hechas *a posteriori* pusieron de manifiesto que el lumen de los túbulos de Malpighi fue el sitio de desarrollo del protista (Fig. 1), sin observarse anomalías o cambios patológicos en los mismos. Los esporos maduros midieron $4,8 \pm 0,05$ (4,0 – 6,0) $\mu\text{m} \times 2,4 \pm 0,03$ (1,6 – 3,2) μm (n = 75), mostraron una intensa refringencia (Fig. 5), presentaron una forma oval bicóncava (Figs. 2 - 3) y se hallaron frecuentemente agrupados en número variable (cúmulos de esporos) (Fig. 4). El protista se detectó en abejas obreras adultas de seis colmenas del mismo apiario en julio, septiembre y octubre de 2006 con una prevalencia que varió entre 1 y 16,7% (n = 100 por colmena). La intensidad promedio fue de $5,71 \pm 1,49 \times 10^6$ esporos/abeja ($1,43 \times 10^5$ – $1,89 \times 10^7$) (n = 18). El 70,8 % de los casos (n = 24) se presentó en forma conjunta con microsporidios del género *Nosema*, probablemente *N. ceranae* Fries *et al.* (Plischuk, 2010).

La morfología general de los esporos maduros (ovales bicóncavos), la presencia de cúmulos de esporos, la localización en el lumen de los túbulos de Malpighi y la identidad de la especie huésped sugieren fuertemente



Figs. 1-5. Fotomicrográficas de *Nephridiophaga* sp. en *Apis mellifera* L. de Argentina. 1, parte de un túbulo de Malpighi [TM] conteniendo esporos maduros [Flecha] (Escala = 10 μ m); 2 - 3, esporos maduros (Escala = 2 μ m); 4, cúmulo de esporos disturbado (Escala = 10 μ m); 5, esporos de Nephridiophagidae [N] y *Nosema* sp. [n] en coinfección (Escala = 5 μ m).

que se trata de *Nephridiophaga apis* Ivani, especie tipo. Desde su descripción original en abejas de los Balcanes (Ivani, 1937), la que desafortunadamente no provee datos esenciales (particularmente el tamaño y la forma precisa de los esporos) para realizar una comparación válida, no se registraron nuevos hallazgos ni se realizaron aportes adicionales al conocimiento de este nefridiofágido. Por ello, optamos provisionalmente por considerar el protista hallado en abejas de Dufaur como *Nephridiophaga* sp.

Un aspecto relevante a tener en cuenta, respecto del registro de *Nephridiophaga* sp. en abejas de nuestro país, radica en su eventual patogenia. No existe consenso acerca del tipo de relación simbiótica (mutualismo, comensalismo o parasitismo) entre los nefridiofágidos y sus huéspedes. Lange (1993) sugirió una relación de tipo comensalista entre *Nephridiophaga periplanetae* (Lutz & Splendore) Lange y su huésped, la cucaracha *Blatta orientalis* L. (Dictyoptera: Blattidae). Por el contrario,

Ivani (1937) se refirió a *N. apis* como "muy virulento, capaz de provocar lisis en las células de los túbulos, transformándolas en una masa amorfa". Será necesario realizar inoculaciones experimentales (bioensayos) para dilucidar este aspecto, ya que la información obtenida hasta el presente resulta contradictoria. Por un lado, no hemos observado signos patológicos típicos (hipertrofia, cambios de coloración, rotura) que suelen caracterizar las infecciones causadas por otros protistas esporogénicos o formadores de quistes de comprobada patogenia en los túbulos de Malpighi de insectos, como *Liebermannia dichroplusae* Lange, *Malameba locustae* King & Taylor o *Malpighamoeba mellificae* Prell (Lange, 1987, Sokolova *et al.*, 2007; Plischuk & Lange, 2010; Lange & Lord, en prensa). Por otro lado, las cargas de esporos estimadas fueron considerablemente elevadas para un simbiote presente solo en los túbulos de Malpighi y que podría ser causante de ciertas anormalidades aún no detectadas. En relación a la alta tasa de coinfecciones con *Nosema* sp., se desconocen las posibles implicancias de tales infecciones mixtas, y, hasta no contar con estudios experimentales, es preferible no especular al respecto.

Es complejo, por último, esgrimir una explicación convincente acerca de la existencia de solo dos hallazgos de este protista, separados por aproximadamente 70 años y 12.000 Km. de distancia. Una alternativa plantea que la especie registrada podría no ser *Nephridiophaga apis*, sino una especie críptica del mismo género. Otro de los posibles motivos sería la similitud en forma y tamaño con especies de microsporidios conocidas para *Apis mellifera*, como *Nosema ceranae* y *Nosema apis* Zander; de modo que análisis poco minuciosos, utilizando microscopía óptica (técnica mas común en laboratorios de diagnóstico de enfermedades apícolas), podrían generar determinaciones erróneas incluso en infecciones conjuntas (Fig. 5). Por último, otra opción viable es que este organismo mantendría, de hecho, una prevalencia extremadamente baja en la naturaleza; lo que atribuiría más valor aún al presente hallazgo, el cual constituye

el primer registro de una especie de Nephridiophagidae asociada a *A. mellifera* fuera del continente europeo y permitirá obtener un mejor conocimiento de una enigmática especie protista.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico brindado. Especiales agradecimientos al Sr. R. Zaffora, a la Dra. B. Pión, y a los Dres. D. Dimitriev y H. Braun.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. FABEL, P., R. RADEK & V. STORCH. 2000. A new spore-forming protist, *Nephridiophaga blaberi* sp. nov., in the Death's Head cockroach *Blaberus craniifer*. *Europ. J. Protistol.* 36: 387-395.
2. HAUSMANN, K., N. HÜLSMANN & R. RADEK. 2003. *Protistology*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
3. IVANI, M. 1937. Die Entwicklungsgeschichte und die parasitäre Zerstörungsarbeit einer in den Zellen der Malpighi'schen Gefäße der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) schmarotzenden Haplosporidie, *Nephridiophaga apis* gen. nov. spec. nov. *La Cellule* 45: 291-324.
4. LANGE, C. E. 1987. Histopathology in the Malpighian Tubules of *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae) infected with *Perezia dichroplusae* (Microspora: Pereziiidae). *J. Invertebr. Pathol.* 50(2): 146-150.
5. LANGE, C. E. 1993. Unclassified Protists of Arthropods: The Ultrastructure of *Nephridiophaga periplanetae* (Lutz & Splendore, 1903) N. comb., and the affinities of the Nephridiophagidae to other protists. *J. Eukariot. Microbiol.* 40(6): 689-700.
6. LANGE, C. E. & J. E. HENRY. 1996. Métodos de estudio y producción de protistas entomopatógenos. En: Lecuona, R. (ed.), *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*, Mariano Mas, Argentina, pp. 169-176.
7. LANGE, C. E. & J. LORD. En prensa. Protistan entomopathogens. En: Vega, B. & H. Kaya (eds.), *Insect Pathology*, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam.
8. PERKINS, F. O. 2000. Phylum Haplosporidia. En: Lee J. J., G. F. Leedale & P. Bradbury (eds.), *An illustrated guide to the Protozoa*, Vol. II, Soc. of Protozool., Lawrence, pp. 1328-1341.
9. PLISCHUK, S. Inéd. Protistas (Protista) entomopatógenos asociados a apoideos (Hymenoptera: Apoidea) polinizadores de la región Pampeana. Tesis, La Plata, Universidad Nacional de La Plata, 2010, 155 pp.
10. PLISCHUK, S. & C. E. LANGE. 2010. Detección de *Malpighamoeba mellificae* (Protista: Amoebozoa) en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (3-4): 299-303.

11. RADEK, R. & W. HERTH. 1999. Ultrastructural investigation of the spore-forming protist *Nephridiophaga blatellae* in the Malpighian tubules of the German cockroach *Blatella germanica*. *Parasitol. Res.* 85: 216-231.
12. RADEK, R., D. WELLMANNS & A. WOLF. 2011. Two new species of *Nephridiophaga* (Zygomycota) in the Malpighian tubules of cockroaches. *Parasitol. Res.* DOI 10.1007/s00436-001-2278-7.
13. RINGUELET, R. 1947. *Difusión de las enfermedades parasitarias de las abejas en la Argentina y las medidas para combatirlas*. Ministerio de Agricultura de la Nación, Buenos Aires.
14. SOKOLOVA, Y. Y., C. E. LANGE & J. R. FUXA. 2007. Establishment of *Liebertmannia dichroplusae* n. comb. on the basis of molecular characterization of *Perezia dichroplusae* Lange, 1987 (Microsporidia). *J. Eukariot. Microbiol.* 54(3): 223-230.
15. UNDEEN, H. H. & J. VÁVRA. 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. *En: L. Lacey (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, San Diego, pp. 117-151.
16. WYLEZICH, C., R. RADEK & M. SCHLEGEL. 2004. Phylogenetische Analyse der 18S rRNA identifiziert den parasitischen Protisten *Nephridiophaga blatellae* (Nephridiophagidae) als Vertreter der Zygomycota (Fungi). *Denisia* 13: 435-442.

